



(19)

Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11)

**EP 1 260 508 A1**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**  
published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:

27.11.2002 Bulletin 2002/48

(51) Int Cl<sup>7</sup>: **C07D 311/16, C07D 311/82, G01N 31/00**(21) Application number: **01908143.9**(86) International application number:  
**PCT/JP01/01504**(22) Date of filing: **28.02.2001**(87) International publication number:  
**WO 01/064664 (07.09.2001 Gazette 2001/36)**

(84) Designated Contracting States:

**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE TR**  
Designated Extension States:  
**AL LT LV MK RO SI**

(72) inventors:

- **NAGANO, Tetsuo**  
Suginami-ku, Tokyo 167-0032 (JP)
- **URANO, Yasuteru**  
Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0 (JP)
- **SETSUKINAI, Ken-ichi**  
Edogawa-ku, Tokyo 134-0087 (JP)

(30) Priority: **29.02.2000 JP 2000054557**

(71) Applicants:

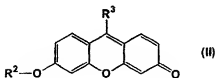
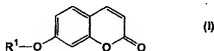
- **DAIICHI PURE CHEMICALS CO. LTD.**  
Chuo-ku Tokyo 103-0027 (JP)
- **Nagano, Tetsuo**  
Suginami-ku, Tokyo 167-0032 (JP)

(74) Representative:

**Sternagel, Fleischer, Godemeyer & Partner**  
Patentanwälte  
An den Gärten 7  
51491 Overath (DE)

**(54) REAGENTS FOR THE QUANTITATION OF ACTIVE OXYGEN**

(57) A compound represented by general formula (I) or (II) or a salt thereof and an agent for measurement of a reactive oxygen comprising said compound or a salt thereof:



wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> independently represent an aryl group which may be substituted, e.g., a phenyl group substituted with an amino group or a hydroxy group, and R<sup>3</sup> represents a 2-carboxyphenyl group which may be substituted.

EP 1 260 508 A1

## EP 1 260 508 A1

## Description

## Technical Field

5 [0001] The present invention relates to a compound or a salt thereof useful as an agent for measurement of a reactive oxygen. The present invention also relates to an agent for measurement of a reactive oxygen comprising the aforementioned compound or a salt thereof.

## Background Art

10 [0002] It is known that, in living organisms and life phenomena, free radical species such as nitrogen monoxide act as a second messenger for signal transduction, and they exert various physiological functions, for example, control of blood pressure in the circulatory system and the like. Reactive oxygen, which is one type of free radical species, is a generic term for superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen and the like. Among them, superoxide anion and hydrogen peroxide have already been revealed to exert important physiological functions in the immune system and the like. There are also many articles reporting that hydroxyl radical has been found to be involved in vascular disorders or brain disorders after ischemia or DNA modification by ultraviolet, and the radical is considered to be a reactive oxygen species having particularly high harmful nature in relation to causes and pathologies of diseases. As for singlet oxygen, its role and the like has little been revealed so far. Recently, some evidence has been obtained suggesting that singlet oxygen is a reactive species in the photodynamic therapy, which is one of cancer therapies, and is generated by various kinds of oxidases, peroxidases and the like in living organisms, which suggests its role of important physiological functions.

20 [0003] Elucidation of the role of reactive oxygen species in living organisms has thus become more and more important. However, there are many problems in methods for measurement of the species. As for methods for measurement of hydroxyl radical, various reports have been made on its measurement by the electron spin resonance (ESR) method. However, the ESR method has fundamental difficulty of using living cells as measurement samples, and the measurement and the evaluation at an individual cell level are practically impossible. A method is also known in which DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Molecular Probes, catalog No. D-399), which is capable of measuring wide variety of reactive oxygen species, is used together with an inhibitor against generation of other reactive oxygen species, and hydroxyl radical is detected under a microscope. However, results obtained in the coexistence of the inhibitor includes some factors different from reactions in a living organism. In addition, DCFH-DA is very susceptible to autooxidation, and for this reason, background fluorescence by autooxidation interferes the detection when the same field is needed to be observed several times. The method is also very inconvenient from viewpoint of operability and storability as it requires operations in the dark.

35 [0004] Ten or more kinds of methods have been known as methods for measurement of singlet oxygen, including the chemiluminescence method, the ESR method, and the luminescence method. However, these methods in common give only low specificity and sensitivity, and thus they are not reliable methods (as for the method for specific detection of singlet oxygen, see, Nagano, T., et al., Free radicals in Clinical Medicine, Vol. 7, pp. 35-41, 1993 and the like). The DCFH-DA may be used in the measurement of singlet oxygen, however, problems of DCFH-DA, per se, cannot be avoided. Therefore, it has been desired to develop a method for measurement of singlet oxygen species, which can be used in research of reactive oxygen species and is excellent in specificity and sensitivity with easy operability.

## Disclosure of the Invention

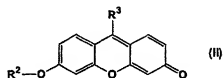
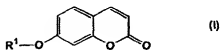
45 [0005] An object of the present invention is to provide a compound useful as an agent for measurement of a reactive oxygen such as hydroxyl radical and singlet oxygen. Another object of the present invention is to provide an agent for measurement of a reactive oxygen comprising said compound, and to provide a method for measurement of a reactive oxygen using said compound. More specifically, the object of the present invention is to provide an agent for accurately and conveniently measuring a reactive oxygen that are localized in a particular class of cells or tissues in a living organism by a bioimaging technique.

50 [0006] The inventors of the present invention conducted various studies to achieve the foregoing objects. As a result, they succeeded in providing an agent for specifically detecting singlet oxygen (International Publication WO 99/51586). The inventors further conducted researches, and found that a substantially non-fluorescent compound represented by the general formula (I) or (II) is efficiently reacted with a reactive oxygen under physiological conditions to give a dearylated fluorescent compound, and that a reactive oxygen can be measured with very high specificity and sensitivity by using the compound represented by the general formula (I) or (II) as an agent for measurement of hydroxyl radical or singlet oxygen to measure the fluorescence of the dearylated compound generated upon the reaction with a reactive oxygen which are localized in living cells or living tissues. They also found that the compound represented by the general

## EP 1 260 508 A1

formula (I) or (II) is not absolutely affected by autoxidation. The present invention was achieved on the basis of these findings.

[0007] The present invention thus provides a compound represented by general formula (I) or (II) or a salt thereof:



wherein R¹ and R² independently represent an aryl group which may be substituted and R³ represents a 2-carboxy-phenyl group which may be substituted. According to preferred embodiments of the present invention, provided are the aforementioned compound or a salt thereof in which R¹ and R² represent a phenyl group substituted with an amino group or a hydroxy group; and the aforementioned compound or a salt thereof in which R³ is a 2-carboxyphenyl group. [0008] From another aspect of the present invention, an agent for measurement of a reactive oxygen is provided which comprises the compound represented by the general formula (I) or (II) or a salt thereof. The present invention further provides a method for measurement of a reactive oxygen which comprises the steps of: (A) reacting the compound represented by the general formula (I) or (II) or a salt thereof with a reactive oxygen; and (B) measuring fluorescence of a dearylated compound or a salt thereof generated in the above step (A) (a compound represented by the general formula (I) in which R¹ is a hydrogen atom or a compound represented by general formula (II) in which R² is a hydrogen atom).

### Brief Explanation of Drawings

#### [0009]

Fig. 1 shows an excitation spectrum and a fluorescence spectrum of a 10  $\mu$ M solution of the compound (ss-3F) of the present invention obtained in Example 3.

Fig. 2 shows results of measurements of changes in fluorescence intensity with time where a singlet oxygen generation system, i.e., EP-1, was added to a 10  $\mu$ M solution of the compound (ss-3F) of the present invention obtained in Example 3.

Fig. 3 shows an excitation spectrum and a fluorescence spectrum of the solution after the completion of the reaction shown in Fig. 2.

Fig. 4 shows results of measurements of changes in fluorescence intensity with time where a hydroxyl radical generation system, i.e., hydrogen peroxide and ferrous perchlorate, was added to a 10  $\mu$ M solution of the compound (ss-3F) of the present invention obtained in Example 3.

Fig. 5 shows an absorption spectrum of 10  $\mu$ M compound (ss-3F) of the present invention dissolved in a sodium phosphate buffer (pH 7.4).

Fig. 6 shows a result of analysis by HPLC of a solution containing the compound (ss-3F) of the present invention obtained in Example 3. In the figure, indicated are results obtained from (A) a 10  $\mu$ M ss-3F solution, (B) a reaction solution prepared by adding EP-1 to a 10  $\mu$ M ss-3F solution to a final concentration of 5 mM, followed by reaction at 37°C for 8 hours, (C) a solution prepared by adding hydrogen peroxide to a 10  $\mu$ M ss-3F solution to a final concentration of 1 mM, adding ferrous perchlorate thereto to a final concentration of 500  $\mu$ M, and then allowing to stand at room temperature for about 3 hours, and (D) a 1  $\mu$ M fluorescein solution.

Fig. 7 shows an excitation spectrum and a fluorescence spectrum of a 10  $\mu$ M solution of the compound (ss-3) of the present invention obtained in Example 1.

Fig. 8 shows an excitation spectrum and a fluorescence spectrum after the completion of the reaction between a 10  $\mu$ M solution of the compound (ss-3) of the present invention obtained in Example 1 and singlet oxygen.

Fig. 9 shows the result of examination of reactivity between the compounds of the present invention (ss-1F and ss-3F) and HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In the figure, indicated are results obtained from (A) ss-1F and (B) ss-3F. Numerical values

## EP 1 260 508 A1

in the figure represent  $H_2O_2$  concentrations.

## Best Mode for Carrying out the Invention

5 [0010] All disclosures in the specification and claims of Japanese Patent Application No. 2000-54557 are incorporated herein by reference.

[0011] As the aryl group represented by  $R^1$  or  $R^2$ , for example, a monocyclic, bicyclic, or tricyclic aryl group having about 6 to 14 ring-constituting atoms can be used. Preferably a phenyl group or a naphthyl group, and more preferably a phenyl group can be used. The aryl group may have one or more substituents on the ring. When the aryl group has two or more substituents, they may be the same or different. The type and substituting position of the substituent are not particularly limited. For example, a  $C_{1-6}$  alkyl group (the alkyl group may be any of linear, branched, cyclic, or a combination thereof, and the same shall apply to an alkyl moiety of other substituents having the alkyl moiety), a  $C_{1-6}$  haloalkyl group, a  $C_{1-6}$  alkenyl group, a  $C_{1-6}$  alkoxy group, a halogen atom (the halogen atom may be any of a fluorine atom, a chlorine atom, a bromine atom, or an iodine atom), a cyano group, a nitro group, an optionally substituted amino group, a carboxyl group, an alkoxycarbonyl group, a  $C_{1-6}$  haloalkenyl group, a  $C_{1-6}$  haloalkenyl group, an aroyl group, a hydroxy group, an alkylendioxy group or the like may be used as the substituent.

[0012]  $R^1$  or  $R^2$  is preferably a substituted phenyl group and a monosubstituted phenyl group is more preferable. As the monosubstituted phenyl group, a phenyl group having non-substituted amino group or a hydroxy group is particularly preferred. A substituting position of the substituent is preferably in *ortho*-position or *para*-position. A benzene ring of a 2-carboxyphenyl group represented by  $R^3$  may have one or more substituents. When the benzene ring has two or more substituents, they may be the same or different. The group explained for the aforementioned aryl group can be used as a substituent on the benzene ring, and  $R^3$  is preferably a non-substituted 2-carboxyphenyl group.

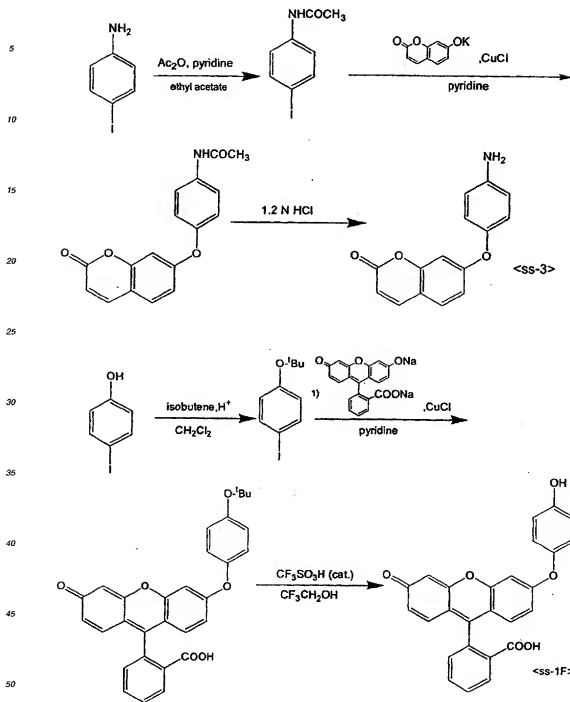
[0013] The compound represented by the general formula (I) or (II) can exist as a salt. Examples of salts include a base addition salt, an acid addition salt, and an amino acid salt. Examples of the base addition salts include: metal salts such as sodium salts, potassium salts, calcium salts, and magnesium salts; ammonium salts; and organic amine salts such as triethylamine salts, piperidine salts, and morpholine salts. Examples of the acid addition salts include: mineral acid salts such as hydrochlorides, sulfates, and nitrates; and organic acid salts such as methanesulfonates, *p*-toluenesulfonates, citrates, and oxalates. Examples of the amino acid salts include glycine salts. However, salts of the compounds of the present invention are not limited to these examples.

[0014] Among them, physiologically acceptable water-soluble salts can be suitably used for the agent and the measuring method of the present invention. Further, the compound represented by the general formula (I) or (II) in a free form or a salt thereof may exist as a hydrate or a solvate, and any of these substances fall within the scope of the present invention. The types of solvents that form the solvates are not particularly limited. For example, solvents such as ethanol, acetone, and isopropanol can be exemplified.

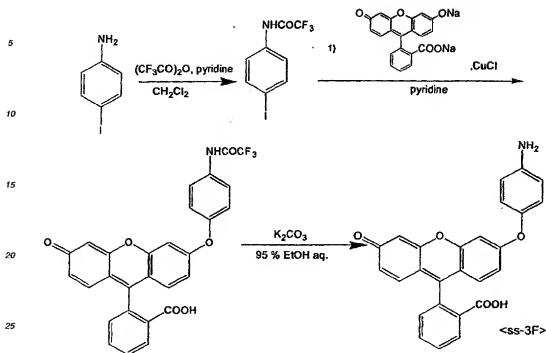
[0015] The compound represented by general formula (I) or (II) may have one or more asymmetric carbons depending on the type of the substituent, and stereoisomers such as optical isomers or diastereoisomers may exist. These stereoisomers in pure forms, any mixtures of these stereoisomers, racemates and the like fall within the scope of the present invention. In addition, the compound represented by formula (II) of the present invention may form a lactone ring in the molecule. It should be recognized that the compounds in which a lactone ring is formed also fall within the scope of the present invention. Optically active substances due to the aforementioned lactone formation also fall within the scope of the present invention.

[0016] The compound of the present invention represented by the general formula (I) or (II) can be prepared generally by arylating a corresponding coumarin compound (a compound represented by the general formula (I) in which  $R^1$  is a hydrogen atom) or a fluorescein compound (a compound represented by the general formula (II) in which  $R^2$  is a hydrogen atom). In general, an alkali metal salt of a coumarin compound or a fluorescein compound is prepared beforehand, and then the salt is reacted with an aryl iodide compound in a suitable solvent in the presence of cuprous chloride. Methods for preparation of typical compounds represented by the general formula (I) or (II) of the present invention are shown in the following schemes. The preparation methods shown in the schemes are more specifically detailed in Examples of the specification. Accordingly, one of ordinary skill in the art can prepare any compounds according to the present invention by suitably choosing a starting material and a reagent based on the explanations in the Examples and appropriately altering or modifying reaction conditions and steps, if necessary.

EP 1 260 508 A1



## EP 1 260 508 A1



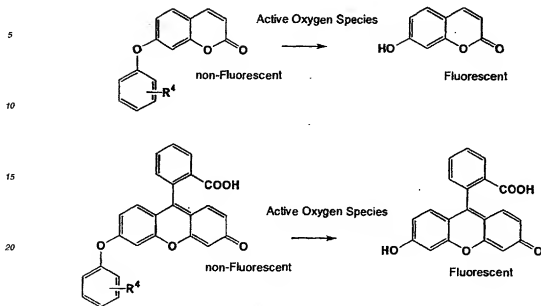
30 [0017] A target compound can sometimes be efficiently prepared by performing the reaction by optionally protecting a particular class of functional group in the reaction steps. Detailed explanations of protective groups are given in, for example, Protective Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene, John Wiley & Sons, Inc., 1981, and therefore, one of ordinary skill in the art can choose suitable protective groups.

35 [0018] In the above preparations, isolation and purification of the products can be performed by an appropriate combination of techniques used in the field of organic synthesis, for example, filtration, extraction, washing, dehydration, concentration, crystallization, various chromatography techniques and the like. The synthetic intermediates in the aforementioned steps can be used for the subsequent reaction without particular purification. Where a salt of the compound of the present invention is prepared, when a salt of each compound is obtained in the above preparation method, the resulting salt, per se, may be purified. When a compound in a free form is obtained, the compound in a free form can be dissolved or suspended in a suitable solvent and then added with a base to form a salt, and the resulting salt may be purified, if necessary.

40 [0019] The compound of the present invention represented by the general formula (I) or (II) or a salt thereof has a property that it reacts with a reactive oxygen under a mild condition, for example, a physiological condition, to give a dearylated coumarin compound (corresponding to a compound represented by general formula (I) in which  $R^1$  is a hydrogen atom) or a fluorescein compound (corresponding to a compound represented by general formula (II) in which  $R^2$  is a hydrogen atom) or a salt thereof. The compound represented by the general formula (I) or (II) or a salt thereof is substantially non-fluorescent, whereas the dearylated coumarin compound or the fluorescein compound or a salt thereof has a property of emitting fluorescence with high intensity. Therefore, by subjecting a compound represented by the general formula (I) or (II) or a salt thereof to react with a reactive oxygen, and then measuring fluorescence of the dearylated compound or a salt thereof, the reactive oxygen can be measured selectively with high sensitivity.

55

## EP 1 260 508 A1



(In the scheme,  $R^4$  represents a *p*-amino group, an *o*-amino group, a *p*-hydroxy group, an *o*-hydroxy group and the like, and the reactive oxygen species is singlet oxygen, hydroxyl radical or the like.)

[0020] The types of reactive oxygens which are measurable by the agent of the present invention are not particularly limited. For example, any of superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen, and hydrogen peroxide can be measured. In particular, singlet oxygen and hydroxyl radical can be measured with high sensitivity and selectivity. For example, when the compound represented by general formula (I) or (II) or a salt thereof is used as an agent for measurement of a reactive oxygen, reactive oxygens localized in an individual cell or a particular class of tissue can be accurately and conveniently measured.

[0021] The term "measurement" used in the present specification should be construed in its broadest sense, including determinations, tests, and detections performed for the purpose of quantification, qualification, diagnosis or the like. The method for measuring a reactive oxygen of the present invention generally comprises the steps of: (A) reacting a compound represented by the general formula (I) or (II) or a salt thereof with a reactive oxygen; and (B) measuring fluorescence of a dearylated compound or a salt thereof produced in the above step (A) (corresponding to a compound represented by general formula (I) in which  $R^1$  is a hydrogen atom or a compound represented by general formula (II) in which  $R^2$  is a hydrogen atom).

[0022] The fluorescence of the dearylated compound or a salt thereof may be measured by a conventional method. A method for measurement of a fluorescence spectrum *in vitro*, a method for measurement of a fluorescence spectrum *in vivo* by a bioimaging technique and the like may be employed. For example, when quantification is performed, it is preferred to prepare a calibration curve beforehand according to a conventional method. As a quantitative hydroxyl radical generation system, for example, a gamma-radiolysis method can be used. As a singlet oxygen generation system, for example, the naphthalene endoperoxide system (Saito, I., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, pp. 6329-6334, 1985) can be used. The agent of the present invention has a property to be taken up intracellularly, and accordingly, the agent enables measurement of reactive oxygens localized in individual cells with high sensitivity by a bioimaging technique.

[0023] From another aspect of features of the compound of the present invention or a salt thereof, said compound or a salt thereof can specifically measure activity of an enzyme such as peroxidase, in which enzymatic reaction a reactive oxygen involves. Accordingly, the agent comprising the compound of the present invention or a salt thereof is useful as an agent for measurement of activity of an enzyme such as a peroxidase in which reaction a reactive oxygen involves.

[0024] The compound represented by the general formula (I) or (II) or a salt thereof, per se, may be used as the agent for measurement of a reactive oxygen of the present invention. If necessary, a composition may be used which is formulated with additives commonly used for preparation of a reagent. For example, additives such as solubilizers,

## EP 1 260 508 A1

pH adjusters, buffers, and isotonic agents can be used as additives for use of the agent in a physiological condition, and amounts of these additives can be suitably chosen by one of ordinary skill in the art. The compositions may be provided as compositions in appropriate forms, for example, powdery mixtures, lyophilized products, granules, tablets, solutions and the like.

### Examples

[0025] The present invention will be more specifically explained by way of examples. However, the scope of the present invention is not limited to these examples.

Example 1: Synthesis of ss-3 (a compound represented by general formula (I) in which R<sup>1</sup> is a *p*-aminophenyl group)

#### 1) Synthesis of 4-Iodoacetanilide

[0026] 4-Iodoaniline (11.0 g, 50.4 mmol) was dissolved in 60 mL of ethyl acetate and the solution was added with 10 mL of acetic anhydride (10.8 g, 106 mmol) and 7.8 mL of pyridine (7.65 g, 99.4 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 2 hours with an equipment of a CaCl<sub>2</sub> tube. A solvent was evaporated under reduced pressure to obtain 4-iodoacetanilide (yield: 13.0 g, percent yield: 99.0%).

m.p.: 174.5 to 175.5°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz Acetone-d<sub>6</sub>): δ 2.04 (s, 3H), 7.46 (dd, J = 9.0 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 9.0 Hz, 2.2 Hz, 1H), 9.21 (br, 1H)

EI Mass (M)<sup>+</sup> = 261

#### 2) Synthesis of pre ss-3 (acetyl)

[0027] Potassium *t*-butoxide (123 mg, 1.10 mmol) was dissolved in a mixed solvent of 8 mL of benzene and 3 mL of methanol. The solution was then added with 7-hydroxycoumarin (196 mg, 1.21 mmol) and stirred for dissolution. The solvent was then removed by evaporation under reduced pressure to obtain a 7-hydroxycoumarin potassium salt. A solution of 4-iodoacetanilide (1.11 g, 4.26 mmol) dissolved in 12 mL of pyridine and cuprous chloride (124 mg, 1.25 mmol) were added to a 25 mL eggplant-type flask containing the 7-hydroxycoumarin potassium salt, and the mixture was heated under reflux under argon stream for 9 hours and 45 minutes. After stand for cooling to room temperature, the reaction mixture was added with 55 mL of water and then acidified with the addition of concentrated hydrochloric acid. The mixture was extracted with ethyl acetate (75 mL x 4), and the combined organic layer was washed with saturated brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (repeated twice using ethyl acetate as a sole eluent for both times) to obtain pre ss-3 (acetyl) as a yellow crystal (yield: 68.7 mg, percent yield: 21.2%).

m.p.: 197.0 to 199.0°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz Acetone-d<sub>6</sub>): δ 2.08 (s, 3H), 6.27 (d, J=9.5 Hz, 1H), 6.79 (d, J=2.4 Hz, 1H), 6.92 (dd, J=8.6 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.09 (d, J=9.0 Hz, 2H), 7.65 (d, J=8.6 Hz, 1H), 7.74 (d, J=9.0 Hz, 2H), 7.93 (d, J=9.5 Hz, 1H)

EI Mass (M)<sup>+</sup> = 295

#### 3) Synthesis of ss-3

[0028] Pre ss-3 (acetyl) (67 mg, 0.227 mmol) was added to 20 mL of 1.2 normal hydrochloric acid, and the reaction system was completely sealed and heated under reflux for 3 hours, and then stirred at room temperature for 1 hour and 30 minutes. The reaction mixture was added with an aqueous solution of saturated sodium hydrogencarbonate (65 mL) and extracted with ethyl acetate (75 mL x 4). The organic layer was washed with saturated brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was then evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluent: dichloromethane/ethyl acetate = 3/1) to obtain ss-3 as a yellow crystal (yield: 38.0 mg, percent yield: 66.2%).

m.p.: 132.5 to 133.5°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz Acetone-d<sub>6</sub>): δ 4.57 (br, 2H), 6.10 (d, J=9.5 Hz, 1H), 6.60-6.78 (m, 5H), 7.47 (d, J=8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, J=9.5 Hz, 1H)

EI Mass (M)<sup>+</sup> = 253



## EP 1 260 508 A1

Example 2: Synthesis of ss-1F (a compound represented by general formula (II) in which R<sup>2</sup> is a *p*-hydroxyphenyl group and R<sup>3</sup> is a 2-carboxyphenyl group)

1) Synthesis of 4-*tert*-butoxyiodobenzene

[0029] 4-Iodophenol (18.7 g, 85.1 mmol) was dissolved in 150 mL of dichloromethane and the solution was bubbled with isobutene until saturation under ice cooling. The mixture was then added with 10 drops of concentrated sulfuric acid and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was washed twice with a 50 mL aqueous solution of 2 normal sodium hydroxide, and the organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain 4-*tert*-butoxyiodobenzene as a white crystal (yield: 16.6 g, percent yield: 70.7%).

m.p.: 40.0 to 41.5°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 1.33 (s, 9H), 6.75 (dd, J=9.0 Hz, 2,4 Hz, 2H), 7.55 (dd, J=9.0 Hz, 2,4 Hz, 2H)

EI Mass (M)<sup>+</sup> = 276

## 2) Synthesis of pre ss-1F (t-butyl)

[0030] Sodium fluorescein (3.75 g, 9.97 mmol), cuprous chloride (3.92 g, 39.6 mmol), and 4-*tert*-butoxyiodobenzene (8.05g, 29.2 mmol) were added to 50 ml of pyridine, and the mixture was heated under reflux under argon stream for 10 hours and 15 minutes. The mixture was added with water (50 ml) and 80 ml of concentrated hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with saturated brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluent: ethyl acetate/n-hexane = 1/1) to obtain pre ss-1F (t-butyl) as a yellow solid (yield: 19.6 mg, percent yield: 0.4%).

m.p.: 136.0 to 138.0°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CD<sub>3</sub>CN): δ 1.33 (s, 9H), 6.62-6.82 (m, 6H), 7.06 (m, 4H), 7.30 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.71-7.83 (m, 2H), 7.98 (d, J=6.4 Hz, 1H)

FAB Mass (M+1)<sup>+</sup> = 481

## 3) Synthesis of ss-1F

[0031] Pre ss-1F (t-butyl) (9.8 mg, 20.4 μmol) was dissolved in 10 mL of 2,2,2-trifluoroethanol, and the solution was added with 5 drops of a dilute solution of trifluoromethanesulfonic acid under ice cooling, and then the mixture was stirred under argon stream for 25 minutes under ice cooling. After the completion of the reaction, the reaction mixture was added with 40 mL of dichloromethane and washed twice with water and then with saturated brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Then the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain ss-1F as a yellow crystal (yield: 6.6 mg, percent yield: 76.9%).

m.p.: 127.0 to 129.0 °C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz Acetone-d<sub>6</sub>): δ 6.48-6.67 (m, 6H), 6.79 (d, J=9.0 Hz, 2H), 6.87 (d, J=9.0 Hz, 2H), 7.17 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.58-7.71 (m, 2H), 7.86 (d, J=7.5 Hz, 1H)

FAB Mass (M+1)<sup>+</sup> = 425

Example 3: Synthesis of ss-3F (a compound represented by general formula (II) in which R<sup>2</sup> is a *p*-aminophenyl group and R<sup>3</sup> is a 2-carboxyphenyl group)

## 1) Synthesis of 4-iodotrifluoroacetanilide

[0032] Trifluoroacetic anhydride (36.0 ml, 216 mmol, 45.0 g) and pyridine (17.0 ml, 210 mmol, 16.6 g) were added to a solution of 4-iodoaniline (25.0 g, 114 mmol) in 100 ml of dichloromethane under ice cooling, and the mixture was stirred under ice cooling until fuming and heat evolution were terminated. The mixture was then immediately returned to room temperature and continuously stirred for 19 hours. After the solvent was evaporated under reduced pressure, the residue was purified by chromatography on silica gel (eluent: ethyl acetate) to obtain 4-iodotrifluoroacetanilide as a light brown solid (yield: 34.1 g, percent yield: 94.8%).

m.p.: 148.5 to 149.0°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ 7.35 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.90 (br, 1H)

EI Mass (M)<sup>+</sup> = 315

## 2) Synthesis of N'-trifluoroacetyl-ss-3F (TFA salt)

[0033] Sodium fluorescein (3.77 g, 10.0 mmol) was dissolved in 50 ml of dimethylacetamide, and the mixture was

## EP 1 260 508 A1

stirred for 20 minutes. The mixture was added with a solution of 4-iodotrifluoroacetanilide (12.8 g, 4.05 mmol) in 60 ml of pyridine, and then added further with cuprous chloride (2.55 g, 25.8 mmol) and heated under reflux under argon stream for 8 hours. After the reaction mixture was cooled to room temperature, the mixture was added with 100 ml of water and further with 65 ml of concentrated hydrochloric acid for acidification. The mixture was extracted three times with ethyl acetate, and the combined organic layer was washed with saturated brine. The organic layer was then dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (eluent: ethyl acetate/n-hexane = 1/1) to obtain pre ss-3F (TFA) as a yellow solid (yield: 76.6 mg, percent yield: 1.48%).  
 m.p.: 116.5 - 118.5°C  
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 6.57-6.87 (m, 6H), 7.18 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.70-7.82 (m, 4H), 8.00 (d, J = 7.5 Hz, 1H)  
 FAB Mass (M+1)<sup>+</sup> = 520

## 3) Synthesis of ss-3F

**[0034]** Pre ss-3F (TFA) (76.6 mg, 0.148 mmol) and anhydrous potassium carbonate (90.3 mg) were dissolved in a mixed solution of 20 ml of ethanol and 1.2 ml of water, and the mixture was heated under reflux for 4 hours. After the solution was cooled to room temperature, ethanol and water were evaporated under reduced pressure. The residue was added with water (20 ml) and then with 10 ml of 2N hydrochloric acid for acidification (pH 1). The mixture was extracted twice with dichloromethane, and the organic layers were combined and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (eluent: ethyl acetate/n-hexane = 1/1) to obtain ss-3F as a yellow solid (yield: 13.6 mg, percent yield: 21.8%).  
 m.p.: 153.5 to 155.0°C  
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, acetone-d<sub>6</sub>): δ 6.60-6.89 (m, 10H), 7.29 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.72 (td, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.80 (td, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 7.5 Hz, 1H)  
 FAB Mass (M+1)<sup>+</sup> = 424

## Example 4

## 1) Fluorescence spectrum

**[0035]** ss-3F obtained in Example 3 was dissolved in DMF to a concentration of 10 mM, and then the solution was added with a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) for dissolution at a final concentration of 10 μM. The excitation spectrum and the fluorescence spectrum of the 10 μM ss-3F solution were measured using a fluorophotometer F4500 (manufactured by Hitachi, Ltd.). Slit width was 2.5 nm for both the excitation spectrum and the fluorescence spectrum, and the photomultiplier voltage was 950 V. Measurement was carried out at the excitation wavelength of 490 nm and the fluorescence wavelength of 510 nm unless otherwise specified. The results are shown in Fig. 1. As clearly shown in Fig. 1, ss-3F, per se, emits no fluorescence.

**[0036]** Subsequently, in order to investigate the reaction between ss-3F and singlet oxygen, a solution of EP-1 (a singlet oxygen generation system, i.e., the naphthalene endoperoxide compound; Saito, I., et al, J. Am. Chem. Soc., 107, pp. 6329-6334, 1985) in dimethylformamide (DMF) was added to the 10 μM ss-3F solution to final concentrations of 1 mM, 2 mM, and 5 mM, and changes in fluorescence intensity with time was measured (EP-1 system). The temperature of the solution at this time was at 37°C. The results are shown in Fig. 2. The excitation spectrum and the fluorescence spectrum of the solution after the completion of the reaction were measured under the same conditions as described above. The results are shown in Fig. 3. As clearly shown in Fig. 2, when ss-3F and EP-1 were allowed to coexist, increase in fluorescence intensity was observed depending on EP-1 concentrations as well as in time dependent manner. Also in Fig. 3, generation of fluorescence was observed, and it was verified that ss-3F generated fluorescence upon reaction with singlet oxygen.

**[0037]** Further, to investigate the reaction between ss-3F and hydroxyl radical, hydrogen peroxide was added to the 10 μM ss-3F solution to a final concentration of 1 mM, and then the mixture was added with ferrous perchlorate to a final concentration of 100 μM for each addition (5 times in total) to measure changes in fluorescence intensity with time (Fenton system). The results are shown in Fig. 4. As shown in Fig. 4, increase in fluorescence intensity was observed at each time of the addition of ferrous perchlorate, which verified that ss-3F emitted fluorescence upon reaction with hydroxyl radical.

## 2) Absorption spectrum

**[0038]** ss-3F was dissolved in DMF at a concentration of 10 mM, and the solution was added with a 100 mM sodium

## EP 1 260 508 A1

phosphate buffer (pH 7.4) so as to give dissolution at a final concentration of 10  $\mu\text{M}$ . The absorption spectrum of the resulting 10  $\mu\text{M}$  ss-3F solution was measured. The results are shown in Fig. 5. It was verified that ss-3F had the absorption maximum at around 455 nm.

## 3) HPLC spectrum

**[0039]** The solutions described below were analyzed by HPLC. The absorbance at 460 nm was measured using XTerra<sup>TM</sup>RP<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$  (4.6 x 250 mm) as a column and an aqueous solution of acetonitrile/0.1M NaHCO<sub>3</sub> = 1/1 as an eluate with an elution rate of 1 ml/min.

(A) the 10  $\mu\text{M}$  ss-3F solution

(B) a reaction solution prepared by adding EP-1 to the 10  $\mu\text{M}$  ss-3F solution so as to give a final concentration of 5 mM and reacting at 37°C for 8 hours

(C) a solution prepared by adding hydrogen peroxide to the 10  $\mu\text{M}$  ss-3F solution so as to give a final concentration of 1 mM, and further adding ferrous perchlorate so as to give a final concentration of 500  $\mu\text{M}$ , and then allowing to stand at room temperature for about 3 hours

(D) a 1  $\mu\text{M}$  fluorescein solution

**[0040]** A peak was detected at a retention time of 3.0 minutes for ss-3F alone (A). For a singlet oxygen generation system (B), a peak different from (A) was detected at 2.3 minutes, and for a hydroxyl radical generation system (C), a peak different from (A) was detected at 2.3 minutes. The peaks detected in (B) and (C) were congruent with a peak of fluorescein (D), i.e., 2.3 minutes. From these results, it was verified that ss-3F reacted with singlet oxygen or hydroxyl radical to generate fluorescein.

## Example 5:

## 1) Fluorescence spectrum

**[0041]** A fluorescence spectrum of ss-3 obtained in Example 1 was measured under the same conditions as those in 1) of Example 4, except that the excitation wavelength was at 370 nm and the fluorescence wavelength was at 450 nm. The result obtained in the absence of EP-1 was shown in Fig. 7, and the result of fluorescence spectrum of the solution after the completion of the reaction with EP-1 was shown in Fig. 8. As shown in Figs. 7 and 8, ss-3 itself is substantially non-fluorescent, but emits fluorescence upon reaction with singlet oxygen.

## Example 6: Comparison of reactivity (specificity) with different reactive oxygen species

**[0042]** The compounds of the present invention, ss-1F, and ss-3F were tested. DCFH (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) was used as a control which was produced by hydrolyzing DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Molecular Probes, D-399) as a commercially available agent for detecting reactive oxygen species. DCFH-DA was hydrolyzed in accordance with the method by Hempel et al. (Stephen L. Hempel et al., Free Radical Biology & Medicine, 27, 146-169, 1999) under an alkali condition to obtain DCFH. More specifically, DCFH-DA was treated with an aqueous solution of sodium hydroxide (pH 12) in the dark for 30 minutes, followed by immediate dilution with a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) so as to give a concentration of 10  $\mu\text{M}$ . The 10  $\mu\text{M}$  DCFH solution was used for the test immediately after the preparation. A 10  $\mu\text{M}$  solution was prepared for each of ss-1F and ss-3F using a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and used in the experiment. Each of ss-1F, ss-3F, and DCFH was treated under conditions "a" to "f" for 30 minutes (2 hours and 30 minutes only for "f") and changes in fluorescence intensity between before and after treatment were measured. The fluorescence intensity was measured under the same conditions as those in Example 4. Each concentration of the fluorescence probe was 10  $\mu\text{M}$  (a 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4). The results are shown in Table 1.

Table 1

Reactive oxygen species	ss-1F	ss-3F	DCFH
Hydroxyl radical <sup>(a)</sup>	$3.3 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$	$4.8 \times 10^3$
Singlet oxygen <sup>(b)</sup>	4.8	8.7	26

(a) Iron(II) perchlorate (100  $\mu\text{M}$ ) and hydrogen peroxide (1 mM) were added.

(b) EP-1 (100  $\mu\text{M}$ ) was added.

## EP 1 260 508 A1

Table 1 (continued)

Reactive oxygen species	ss-1F	ss-3F	DCFH
Superoxide (c)	8.3	5.6	67
Hydrogen peroxide (d)	1.8	<1.0	$1.9 \times 10^2$
Nitrogen monoxide (e)	6.0	<1.0	$1.5 \times 10^2$
Autoxidation (f)	<1.0	<1.0	$1.6 \times 10^3$

(c)  $\text{KO}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) was added.

(d) Hydrogen peroxide (1 mM) was added.

(e) NOC13 (100  $\mu\text{M}$ ) was added.

(f) Allowed to stand just under a fluorescent lamp for 2 hours and 30 minutes.

[0043] DCFH successfully reacted with hydroxyl radical (condition "a") as well as other reactive oxygen species. The reactivity to autoxidation (condition "f") was also high, which occurrence is fundamentally undesirable. In contrast, ss-1F and ss-3F were completely free from autoxidation (condition "f") and had high reactivity to hydroxyl radical.

## Example 7: Specific detection of peroxidase activity

[0044] The compound of the present invention, ss-1F or ss-3F, was dissolved in DMF at a concentration of 10 mM, and the solution was added with a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) so as to become dissolution at a final concentration of 10  $\mu\text{M}$ . A 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) of horseradish peroxidase was added to the resulting solution of ss-1F or ss-3F to a final concentration of 0.2  $\mu\text{M}$ , and then hydrogen peroxide was added to final concentrations of 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, and 5.0  $\mu\text{M}$ , and the fluorescence spectrum was immediately measured. The fluorescence spectrum was measured under the same conditions as those in 1) of Example 4, except that the fluorescence wavelength was at 515 nm. The results were shown in Fig. 9. As clearly shown in Fig. 9, both of ss-1F and ss-3F gave increase in fluorescence intensity in a concentration-dependent manner in the hydrogen peroxide concentration range of between 0 and 5.0  $\mu\text{M}$ .

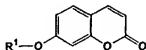
[0045] It is already verified from the result of Example 6 that ss-1F and ss-3F do not react with hydrogen peroxide, per se, and they suffer from no autoxidation. Accordingly, the result of Example 7 verified that the compound of the present invention enables specific and sole measurement of peroxidase activity.

## Industrial Applicability

[0046] The compound of the present invention is useful as an agent for measurement of reactive oxygens such as hydroxyl radical and singlet oxygen. The agent for measurement of reactive oxygens comprising the compound of the present invention and a method for measurement of reactive oxygens using said compound are particularly useful for measurement of reactive oxygens that are localized in particular class of cells or tissues in a living organism accurately and conveniently by using a bioimaging technique.

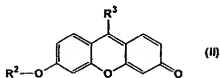
## Claims

1. A compound represented by general formula (I) or (II) or a salt thereof:



(I)

## EP 1 260 508 A1



- 10      wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> independently represent an aryl group which may be substituted and R<sup>3</sup> represents a 2-carboxyphenyl group which may be substituted.
- 15      2. The compound or a salt thereof according to claim 1, wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> represent a phenyl group substituted with an amino group or a hydroxy group.
- 20      3. The compound or a salt thereof according to claim 1 or claim 2, wherein; R<sup>3</sup> is a 2-carboxyphenyl group.
- 25      4. An agent for measurement of a reactive oxygen which comprises the compound according to any one of claims 1 to 3 or a salt thereof.
- 30      5. A method for measurement of a reactive oxygen, which comprises the steps of:  
     (A) reacting the compound according to any one of claims 1 to 3 or a salt thereof with a reactive oxygen; and  
     (B) measuring fluorescence of a dearylated compound or a salt thereof generated in the above step (A).
- 35      6. A method for measurement of an enzymatic activity of an enzyme, in which a reactive oxygen involves in said enzymatic activity, by using the compound according to any one of claims 1 to 3 or a salt thereof.
- 40      7. The method according to claim 6, wherein the enzyme is a peroxidase.
- 45      8. An agent for measurement of an enzymatic activity of an enzyme, in which a reactive oxygen involves in said enzymatic activity, which comprises the compound according to any one of claims 1 to 3 or a salt thereof.
- 50      9. The agent according to claim 8, wherein the enzyme is a peroxidase.
- 55

EP 1 260 508 A1

Fig.1

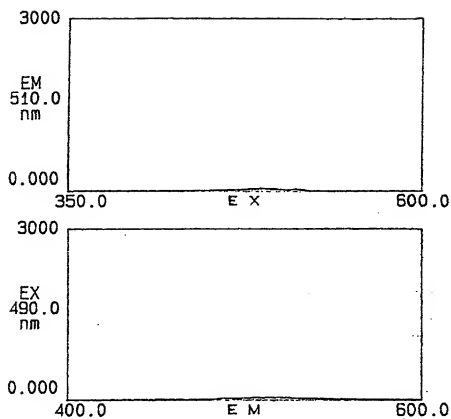
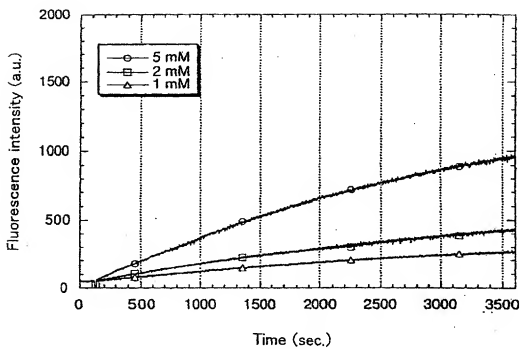
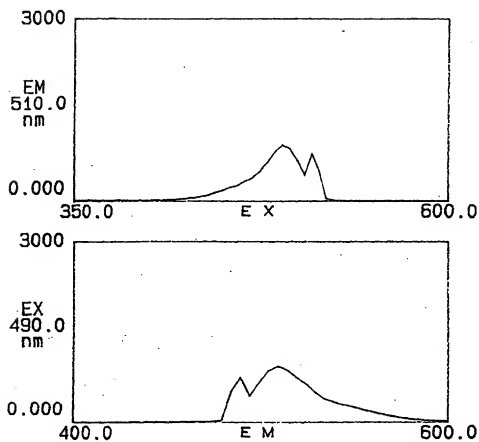


Fig.2



EP 1 260 508 A1

Fig.3





EP 1 260 508 A1

Fig.4

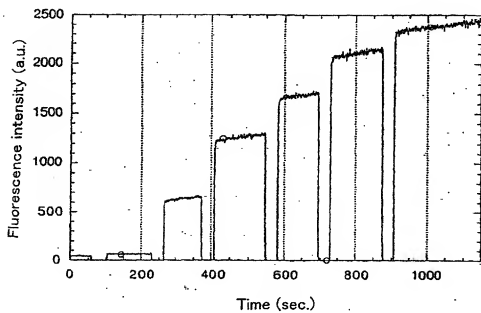
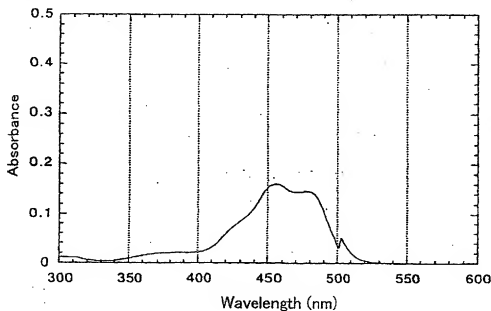
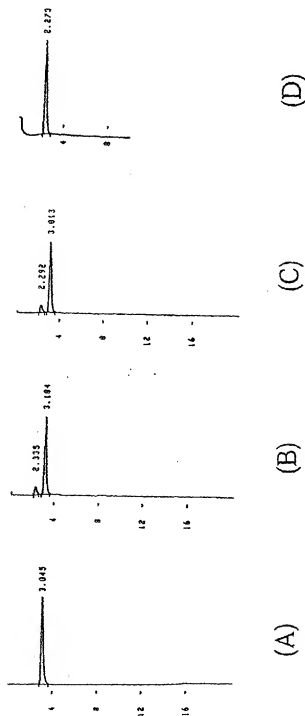


Fig.5



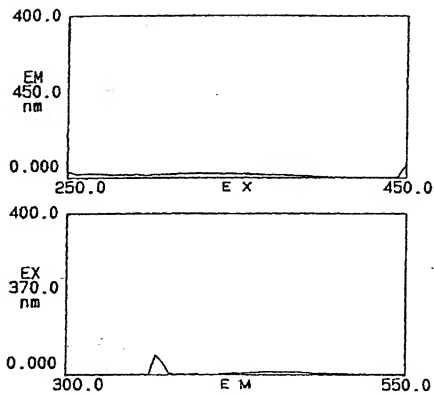
EP 1 260 508 A1

Fig.6



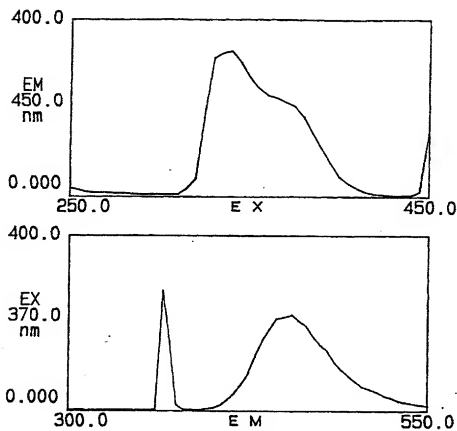
EP 1 260 508 A1

Fig.7



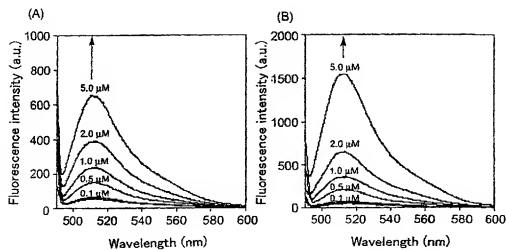
EP 1 260 508 A1

Fig.8



EP 1 260 508 A1

Fig.9



EP 1 260 508 A1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. <sup>7</sup> C07D311/16, C07D311/82, G01N31/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. <sup>7</sup> C07D311/00-96, G01N31/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 515133, A2 (Spectra Group Ltd. Inc.), 25 November, 1992 (25.11.92), entire description & JP, 6-211831, A & WO, 95/14689, A1 & US, 5623080, A	1-9
A	JP, 60-54381, A (Mitsui Toatsu Chemicals Inc.), 28 March, 1985 (28.03.85), entire description (Family: none)	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* "A"	Special citations of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"P" prior document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 05 June, 2001 (05.06.01)		Date of mailing of the international search report 19 June, 2001 (19.06.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年9月7日 (07.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/64664 A1

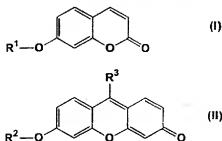
- (51) 国際特許分類: C07D 311/16, 311/82, G01N 31/00 134-0087 東京都江戸川区清新町1丁目1番22号 203 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/01504
- (22) 国際出願日: 2001年2月28日 (28.02.2001) (74) 代理人: 今村正純. 外(IMAMURA, Masazumi et al.); 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目8番7号 京橋日建ビル8階 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GR, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MC, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ: 特願2000-54557 2000年2月29日 (29.02.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 長野哲雄 (NAGANO, Tetsuo) [JP/JP]; 〒167-0032 東京都杉並区天沼1-28-15 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浦野泰昭 (URANO, Yasuteru) [JP/JP]; 〒213-0013 神奈川県川崎市高津区末長498 2ミール裏ヶ谷204 Kanagawa (JP), 瀧月内健一 (SETSUKINAI, Ken-ichi) [JP/JP]; 〒

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドランスノート」を参照。

(54) Title: REAGENTS FOR THE QUANTITATION OF ACTIVE OXYGEN

(54) 発明の名称: 活性酸素測定用試薬



(57) Abstract: Compounds of the general formula (I) or (II) or salts thereof; and reagents for the quantitation of active oxygen, containing the compounds or the salts: wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are each independently optionally substituted aryl, e.g., amino- or hydroxyl-substituted phenyl; and R<sup>3</sup> is optionally substituted 2-carboxyphenyl.

[続表有]

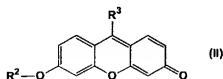
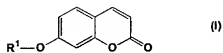
WO 01/64664 A1

WO 01/64664 A1



(57) 要約:

下記の一般式(I)又は(II) :



(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれ独立に置換基を有していてもよいアリール基(アミノ基又は水酸基で置換されたフェニル基など)を示し、R<sup>3</sup>は置換基を有していてもよい2-カルボキシフェニル基を示す)で表される化合物又はその塩、及び該化合物又はその塩を含む活性酸素測定用試薬。



WO 01/64664

PCT/JP01/01504

## 明 細 書

## 活性酸素測定用試薬

## 技術分野

本発明は、活性酸素測定用試薬として有用な化合物又はその塩に関するものである。また、本発明は上記化合物又はその塩を含む活性酸素測定用試薬に関する。

## 背景技術

生体および生命現象において一酸化窒素などのフリーラジカル種が情報伝達のセカンドメッセンジャーとして作用しており、循環器系などにおいて血圧の制御を行うなど多様な生理作用を発揮していることが知られている。フリーラジカル種の一つである、活性酸素はスーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素等を総称するものであるが、これらのうち、スーパーオキシドアニオンや過酸化水素は免疫系などにおいて重要な生理作用を発揮していることが既に明らかにされている。一方ヒドロキシラジカルは血管障害や虚血後の脳障害、あるいは紫外線による DNA 修飾に関わる知見が多数報告され、病因・病態との関係で特に障害性が高い活性酸素種と考えられている。一重項酸素については、従来、その役割等についてほとんど解明されていなかったが、最近、癌治療法の一つであるフォト・ダイナミックセラピー (Photodynamic therapy) の反応種であることや、生体内の各種酸化酵素、ペルオキシダーゼが一重項酸素を生成していることを示唆する知見が得られ、重要な生理作用を担っている可能性が示唆されている。

このように活性酸素種の生体内での役割の解明の重要性が高まっているが、その測定方法については課題が多い。ヒドロキシラジカルを測定する方法については、電子スピン共鳴 (ESR) 法で測定した多数の報告があるが、ESR 法では生細胞を測定試料として使用すること自体が困難であり、個々の細胞レベルでの測定評

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

価は実際上不可能である。一方、活性酸素種を広く測定可能な DCHF-DA (2', 7' -ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート、モレキュラー・プローブス社、カタログ番号 D-399) を他の活性酸素種生成の阻害剤と共に使用して顕微鏡下でヒドロキシラジカルを検出する方法も知られているが、阻害剤共存下の成績は生体内での反応とは異なる要素を含んだものになる。また DCHF-DA は、極めて自動酸化を受けやすいため、同一視野を何度も観察する必要がある場合に、自動酸化によるバックグラウンド蛍光が検出を妨害してしまう。さらに、暗所での操作を必要とするなど操作性、保存性の点で極めて不便な方法であった。

一重項酸素を測定する方法としては、化学発光法、ESR 法、発光法など十数種が知られているが、いずれも特異性及び感度が低く、信頼のおける方法とは言えない（一重項酸素の特異的検出法については Nagano, T., et al., Free radicals in Clinical Medicine, Vol. 7, pp. 35-41, 1993 などを参照のこと）。前記 DCHF-DA を、一重項酸素の測定に使用することもできるが、DCHF-DA 自体が有する問題点は解消されない。従って、活性酸素種の研究に使用可能な、特異性及び感度に優れ、かつ操作が簡便な測定方法の開発が要求されていたのである。

#### 発明の開示

本発明の課題は、ヒドロキシラジカル、一重項酸素などの活性酸素の測定用試薬として有用な化合物を提供することにある。また、本発明の別な課題は、上記化合物を含む活性酸素測定用試薬及び上記化合物を用いた活性酸素の測定方法を提供することにある。特に、生体内の特定の細胞や組織中に局在する活性酸素をバイオイメージングの手法によって正確かつ簡便に測定するための試薬を提供することが本発明の課題である。

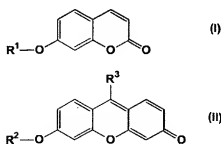
本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力し、一重項酸素に対して特異的な検出試薬を提供することに成功した（国際公開 WO 99/51586 号）。本発明者らはさらに研究を続けた結果、下記の一般式 (I) 又は (II) で表される實質的に非蛍光性の化合物が活性酸素と生理的条件下で効率的に反応して脱アリール化

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

された蛍光性の化合物を与えること、並びに一般式(I)又は(II)で表される化合物をヒドロキシラジカルあるいは一重項酸素測定用試薬として用い、生細胞や生体組織中に局在する活性酸素と反応して生成する脱アリール化合物の蛍光を測定すると、極めて特異的かつ高感度に活性酸素を測定できること、さらには、一般式(I)又は(II)で表される化合物が自動酸化を全くうけないことを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、下記の一般式(I)又は(II)：



(式中、 $R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ独立に置換基を有していてもよいアリール基を示し、 $R^3$ は置換基を有していてもよい2-カルボキシフェニル基を示す)で表される化合物又はその塩を提供するものである。本発明の好ましい態様によれば、 $R^1$ 及び $R^2$ がアミノ基又は水酸基で置換されたフェニル基である上記化合物又はその塩；及び $R^3$ が2-カルボキシフェニル基である上記化合物又はその塩が提供される。

別の観点からは、上記の一般式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩を含む活性酸素測定用試薬が本発明により提供される。さらに、本発明により、活性酸素の測定方法であって、下記の工程：(A)上記一般式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩と活性酸素とを反応させる工程、及び(B)上記工程(A)で生成した脱アリール化合物(上記一般式(I)において $R^1$ が水素原子である化合物又は上記一般式(II)において $R^2$ が水素原子である化合物)又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法が提供される。

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

## 図面の簡単な説明

第1図は、例3で得られた本発明の化合物(ss-3F) 10  $\mu$ M 溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

第2図は、例3で得られた本発明の化合物(ss-3F) 10  $\mu$ M 溶液に一重項酸素発生系である EP-1 を添加して蛍光強度の時間変化を測定した結果を示す。

第3図は、第2図に示した反応終了後の溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

第4図は、例3で得られた本発明の化合物(ss-3F) 10  $\mu$ M 溶液にヒドロキシラジカルの発生系である過酸化水素及び過塩素酸第一鉄を加えて蛍光強度の時間変化を測定した結果を示す。

第5図は、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中に溶解した本発明の化合物(ss-3F) 10  $\mu$ M の吸光スペクトルを示す。

第6図は、例3で得られた本発明の化合物(ss-3F)を含む溶液を HPLC で分析した結果を示す。図中、(A) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液；(B) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 5 mM になるように EP-1 を加えて、37°C で 8 時間反応させた反応溶液；(C) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 1 mM になるように過酸化水素を加え、さらに最終濃度が 500  $\mu$ M になるように過塩素酸第一鉄を加えて、約 3 時間室温に放置した溶液；(D) 1  $\mu$ M フルオレセイン溶液の結果を示す。

第7図は、例1で得られた本発明の化合物(ss-3) 10  $\mu$ M 溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

第8図は、例1で得られた本発明の化合物(ss-3) 10  $\mu$ M 溶液と一重項酸素の反応終了後の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

第9図は、本発明の化合物(ss-1F 及び ss-3F) と HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応性を検討した結果を示す。図中、(A) は ss-1F、(B) は ss-3F の結果を示す。図中の数字は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を示す。

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

発明を実施するための最良の形態

日本国特許出願第 2000-54557 号明細書の開示を参照として全て本明細書の開示に含める。

$R^1$  又は  $R^2$  が示すアリアル基としては、例えば、環構成原子数が 6 個から 14 個程度の単環性、二環性、又は三環性アリアル基を用いることができる。好ましくはフェニル基又はナフチル基、より好ましくはフェニル基を用いることができる。アリアル基は環上に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよい。2 個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。置換基の種類及び置換位置は特に限定されないが、例えば、 $C_{1-6}$  アルキル基（アルキル基は直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせのいずれでもよい。アルキル部分を有する他の置換基のアルキル部分についても同様である。）、 $C_{1-6}$  ハロアルキル基、 $C_{1-6}$  アルケニル基、 $C_{1-6}$  アルコキシル基、ハロゲン原子（ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、シアノ基、ニトロ基、置換基を有することもあるアミノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、 $C_{1-6}$  アルカノイル基、 $C_{1-6}$  ハロアルカノイル基、アロイル基、水酸基、アルキレンジオキシ基などを置換基として用いることができる。

$R^1$  又は  $R^2$  としては置換フェニル基が好ましく、モノ置換フェニル基がより好ましい。モノ置換フェニル基としては、無置換のアミノ基又は水酸基を有するフェニル基が特に好適である。置換基の置換位置としては、オルト位又はパラ位が好ましい。 $R^2$  が示す 2-カルボキシフェニル基のベンゼン環は 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよい。2 個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。ベンゼン環上の置換基としては上記のアリアル基について説明した基を用いることができ、 $R^2$  としては無置換の 2-カルボキシフェニル基が好ましい。

上記一般式 (I) 又は (II) の化合物は塩として存在する場合がある。塩としては、塩基付加塩、酸付加塩、アミノ酸塩などを挙げることができる。塩基付加塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩など

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

の金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩、ピペリジン塩、モルホリン塩などの有機アミン塩を挙げることができ、酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩などの有機酸塩を挙げることができる。アミノ酸塩としてはグリシン塩などを例示することができる。もともと、本発明の化合物の塩はこれらに限定されることはない。

これらのうち、生理学的に許容される水溶性の塩は、本発明の試薬及び測定方法に好適に使用できる。また、遊離形態の一般式(I)又は(II)の化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に包含される。溶媒和物を形成する溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、エタノール、アセトン、イソプロパノールなどの溶媒を例示することができる。

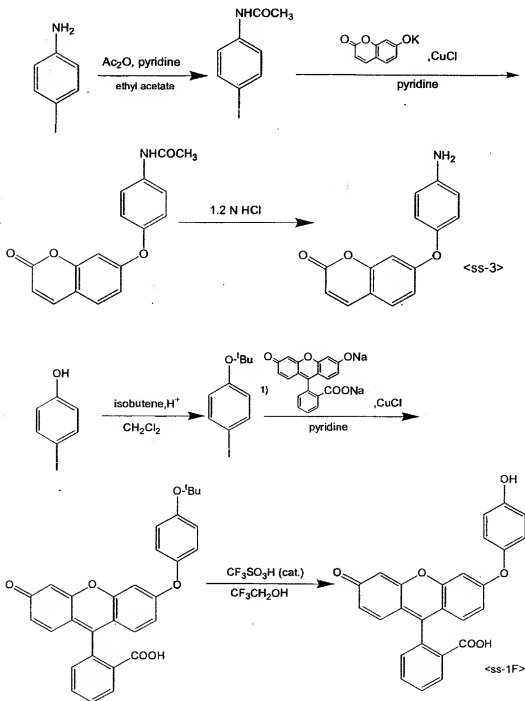
一般式(I)又は(II)で表される化合物は、置換基の種類に応じて1個または2個以上の不斉炭素を有する場合があり、光学異性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体が存在する場合がある。純粋な形態の立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。なお、本発明の式(II)の化合物は分子内でラクトン環を形成することがあるが、ラクトン環を形成した化合物も本発明の範囲に包含されることは言うまでもない。また、上記ラクトン形成に基づく光学活性体も本発明の範囲に包含される。

一般式(I)又は(II)で表される本発明の化合物は、一般的には、対応のクマリン化合物(一般式(I)において $R^1$ が水素原子である化合物)又はフルオレセイン化合物(一般式(II)において $R^2$ が水素原子である化合物)をアリール化することにより製造することができる。一般的には、クマリン化合物又はフルオレセイン化合物のアルカリ金属塩を調製しておき、適当な溶媒中で塩化銅の存在下にヨウ化アリール化合物と反応させればよい。本発明の上記一般式(I)又は(II)で表される化合物の代表的化合物の製造方法を下記のスキームに示す。また、本明細書の実施例には、このスキームに記載した製造方法がより詳細かつ具体的に示されている。

WO 01/64664

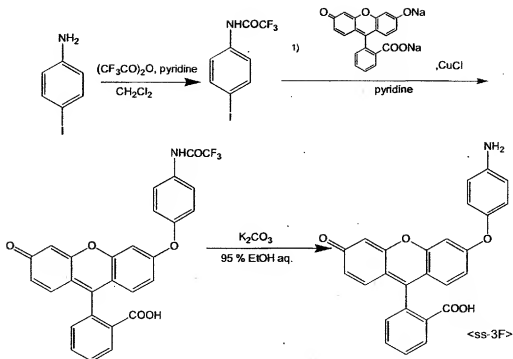
PCT/JP01/01504

る。従って、当業者は実施例の具体的説明を基にして、出発原料及び反応試薬を適宜選択し、必要に応じて反応条件や工程を適宜変更ないし修飾することにより、本発明の化合物をいずれも製造することが可能である。



WO 01/64664

PCT/JP01/01504



なお、反応工程において特定の官能基を必要に応じて保護して反応を行うことにより、目的物を効率的に製造することができる場合があるが、保護基については、プロテクティブ・グループ・イン・オーガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis, T.W.Greene, John Wiley & Sons, Inc., 1981) などに詳しく説明されており、当業者は適宜の保護基を選択することが可能である。

また、上記製造法における生成物の単離、精製は通常の有機合成で用いられる方法、例えば濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、結晶化、各種クロマトグラフィー等を適宜組み合わせを行うことができる。また、上記工程における製造中間体は、特に精製することなく次の反応に供することも可能である。本発明の化合物の塩を製造する場合には、上記製造法においてそれぞれの化合物の塩が得られる場合はそのまま精製すればよればよく、遊離形態の化合物が得られる場合には、遊離形態の化合物を適当な溶媒に溶解又は懸濁した後、塩基を加えて塩を形成させ、

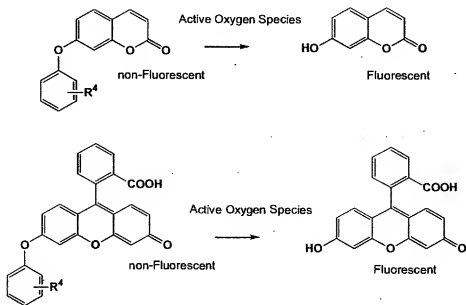


WO 01/64664

PCT/JP01/01504

必要に応じて精製を行えばよい。

上記一般式(I)又は(II)で表される本発明の化合物又はその塩は、緩やかな条件下、例えば生理的条件下で活性酸素と反応して、脱アリール体であるクマリン化合物（一般式(I)において  $R^1$  が水素原子である化合物に相当する）若しくはフルオレセイン化合物（一般式(II)において  $R^2$  が水素原子である化合物に相当する）又はそれらの塩を与える性質を有している。一般式(I)又は(II)の化合物又はその塩は実質的に非蛍光性であり、一方、脱アリール化されたクマリン化合物若しくはフルオレセイン化合物又はそれらの塩は高強度の蛍光を発する性質を有している。従って、上記式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩を活性酸素と反応させた後、脱アリール化された化合物又はその塩の蛍光を測定することによって、活性酸素を選択的かつ高感度に測定することが可能である。



(式中、 $R^4$ はp-アミノ基、o-アミノ基、p-ヒドロキシ基、o-ヒドロキシ基などを示し、活性酸素種(active oxygen species)は一重項酸素又はヒドロキシラジカルなどである)

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

本発明の試薬により測定可能な活性酸素の種類は特に限定されず、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、過酸化水素などのいずれも測定可能であるが、特に一重項酸素及びヒドロキシラジカルを高感度かつ選択的に測定することができる。例えば、一般式(I)又は(II)の化合物又はその塩を活性酸素測定用試薬として用いると、個々の細胞や特定の組織中に局在する活性酸素を正確にかつ簡便に測定できる。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性、又は診断などの目的で行われる測定、検査、検出などを含めて、最も広義に解釈しなければならない。本発明の活性酸素の測定方法は、一般的には、(A)上記一般式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩と活性酸素とを反応させる工程、及び(B)上記工程(A)で生成した脱アリール化合物(上記一般式(I)においてR<sup>1</sup>が水素原子である化合物又は上記一般式(II)においてR<sup>2</sup>が水素原子である化合物に相当する)又はその塩の蛍光を測定する工程を含んでいる。

脱アリール化された化合物又はその塩の蛍光の測定は通常の方法で行うことができ、インビトロで蛍光スペクトルを測定する方法や、バイオイメーシングの手法を用いてインビボで蛍光スペクトルを測定する方法などを採用することができる。例えば、定量を行う場合には、常法に従って予め検量線を作成しておくことが望ましいが、定量的なヒドロキシラジカルの発生系として、例えば、ガンマラジオリシス法などを利用することができ、一重項酸素の発生系として、例えば、ナフグレンエンドパーオキシド系(Saito, I., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, pp. 6329-6334, 1985)などを利用することができる。本発明の試薬は細胞内に取り込まれる性質を有しており、個々の細胞内に局在する活性酸素をバイオイメーシング手法により高感度に測定できる。

また、本発明の化合物又はその塩の特徴を別の面からみれば、ペルオキシダーゼなど酵素反応に活性酸素が関与する酵素の酵素活性を特異的に測定できることから、本発明の化合物又はその塩を含む試薬はペルオキシダーゼなどの活性酸素に関与する酵素の酵素活性を測定するための試薬として有用である。

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

本発明の活性酸素測定用試薬としては、上記式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩をそのまま用いてもよいが、必要に応じて、試薬の調製に通常用いられる添加剤を配合して組成物として用いてもよい。例えば、生理的環境で試薬を用いるための添加剤として、溶解補助剤、pH調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能である。これらの組成物は、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供される。

#### 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1 : ss-3 (一般式 (I) において R<sup>1</sup> が p-アミノフェニル基である化合物) の合成

##### 1) 4-ヨードアセトアニリドの合成

4-ヨードアニリン 11.0 g (50.4 mmol) を酢酸エチル 60 mL に溶かし、そこに無水酢酸 10 mL (10.8 g、106 mmol)、ピリジン 7.8 mL (7.65 g、99.4 mmol) を加え、CaCl<sub>2</sub> 管をつけて室温下 2 時間攪拌した。溶媒を減圧溜去することにより、4-ヨードアセトアニリドを得た (収量 : 13.0 g, 収率 : 99.0 %)。

m. p. 174.5 °C-175.5 °C。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz Acetone-d<sub>6</sub>) ; δ 2.04 (s, 3H), 7.46 (dd, J=9.0 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, J=9.0 Hz, 2.2 Hz, 1H), 9.21 (br, 1H)

EI Mass (M)<sup>+</sup>=261

##### 2) pre ss-3 (アセチル) の合成

カリウム t-ブトキシド 123 mg (1.10 mmol) をベンゼン 8 mL/メタノール 3 mL の混合液に溶かした。その後、7-ヒドロキシクマリン 196 mg (1.21 mmol) を加え攪拌して溶かした。その後、減圧溜去により溶媒を除き、7-ヒドロキシマリ

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

ンカリウム塩を得た。この7-ヒドロキシクマリンカリウム塩の入った 25 mL ナス  
プラスコに 4-ヨードアセトアニリド 1.11g (4.26 mmol) をピリジン 12 mL に溶  
かした溶液と、塩化第一銅 124 mg (1.25 mmol) とを加え、アルゴン気流下で 9  
時間 45 分間加熱還流を行った。室温まで放冷してから、反応液に水 55 mL を加  
え、さらに濃塩酸を加えて酸性にした。酢酸エチル (75 mL x4) で抽出し、集め  
た有機層を飽和食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥後、溶媒を減圧溜去した。残留物  
をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (2 回、展開溶媒はいずれも酢酸エチル  
のみ) により精製し、pre ss-3 (アセチル) を黄色結晶として得た (収量: 68.7  
mg, 収率: 21.2 %)。

m. p. 197.0 °C–199.0 °C。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz Acetone- $d_6$ ) ;  $\delta$  2.08 (s, 3H)、6.27 (d,  $J=9.5$  Hz, 1H)、6.79 (d,  
 $J=2.4$  Hz, 1H)、6.92 (dd,  $J=8.6$  Hz, 2.4 Hz, 1H)、7.09 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H)、7.65 (d,  
 $J=8.6$  Hz, 1H)、7.74 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H)、7.93 (d,  $J=9.5$  Hz, 1H)

EI Mass (M) $^+$ =295

### 3) ss-3 の合成

pre ss-3 (アセチル) 67 mg (0.227 mmol) を 1.2 規定塩酸 20 mL に加え、  
完全に密閉系にしてから 3 時間加熱還流し、その後 1 時間 30 分間室温で攪拌し  
た。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 65 mL を加え、酢酸エチル (75 mL x4) で抽  
出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥後、溶媒を減圧溜去した。残  
留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒; ジクロロメタン/酢酸エ  
チル=3/1) により精製し、ss-3 を黄色結晶として得た (収量: 38.0 mg, 収率:  
66.2 %)。

m. p. 132.5 °C–133.5 °C。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz Acetone- $d_6$ ) ;  $\delta$  4.57 (br, 2H)、6.10 (d,  $J=9.5$  Hz, 1H)、  
6.60–6.78 (m, 5H)、7.47 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H)、7.77 (d,  $J=9.5$  Hz, 1H)

EI Mass (M) $^+$ =253

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

例2：ss-1F（一般式(II)においてR<sup>2</sup>がp-ヒドロキシフェニル基であり、R<sup>3</sup>が2-カルボキシフェニル基である化合物）の合成

#### 1) 4-tert-ブトキシオードベンゼンの合成

4-ヨードフェノール 18.7g (85.1 mmol) をジクロロメタン 150 mL に溶かし、氷冷下で飽和するまでイソブテンをバブルした。その後、濃硫酸 10 滴を加え室温で一晩攪拌した。反応液を2規定水酸化ナトリウム水溶液 50 ml で2回洗い、有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥後、溶媒を減圧溜去することにより4-tert-ブトキシオードベンゼンを白色結晶として得た（収量：16.6g, 収率：70.7 %）。

m. p. 40.0°C-41.5 °C。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz CDCl<sub>3</sub>) ; δ 1.33 (s, 9H)、6.75 (dd, J=9.0 Hz, 2.4Hz, 2H)、7.55 (dd, J=9.0 Hz, 2.4Hz, 2H)

EI Mass (M)<sup>+</sup>=276

#### 2) pre ss-1F (t-ブチル)の合成

フルオレセインナトリウム 3.75 g (9.97 mmol)、塩化第一銅 3.92 g (39.6 mmol)、4-tert-ブトキシオードベンゼン 8.05 g (29.2 mmol) をピリジン 50 ml に加え、アルゴン気流下で10時間15分加熱還流した。反応液に水 50 ml、濃塩酸 80 ml を加え酸性にした後、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：酢酸エチル/n-ヘキサン=1/1）で精製し、pre ss-1F (t-ブチル)を黄色固体として得た（収量：19.6 mg, 収率：0.4 %）。

m. p. 136.0°C-138.0°C

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz CD<sub>3</sub>CN) ; δ 1.33 (s, 9H)、6.62-6.82 (m, 6H)、7.06 (m, 4H)、7.30 (d, J=7.5 Hz, 1H)、7.71-7.83 (m, 2H)、7.98 (d, J=6.4 Hz, 1H)

FAB Mass (M+1)<sup>+</sup>=481

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

## 3) ss-1F の合成

pre ss-1F (t-ブチル) 9.8 mg (20.4  $\mu$ mol) を 2,2-トリフルオロエタノール 10mL に溶かし、氷冷下トリフルオロメタンスルホン酸の希釈液を 5 滴加え、アルゴン気流下、氷冷下で 25 分間攪拌した。反応終了後、反応液にジクロロメタン 40mL を加え、水 (2 回)、飽和食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥した後、溶媒を減圧溜去し、ss-1 を黄色結晶として得た (収量: 6.6 mg, 収率: 76.9 %)。

m. p. 127.0°C–129.0 °C。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz Acetone- $d_6$ ) ;  $\delta$  6.48–6.67 (m, 6H), 6.79 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 6.87 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 7.17 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H), 7.58–7.71 (m, 2H), 7.86 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H)

FAB Mass ( $M+1$ ) $^+$ =425

例 3 : ss-3F (一般式(II)において  $R^2$  が p-アミノフェニル基であり、 $R^3$  が 2-カルボキシフェニル基である化合物) の合成

## 1) 4-ヨードトリフルオロアセトアニリドの合成

4-ヨードアニリン 25.0 g (114 mmol) のジクロロメタン 100 ml 溶液に、トリフルオロ無水酢酸 36.0 ml (216 mmol, 45.0 g) 及びピリジン 17.0 ml (210 mmol, 16.6 g) を氷冷下に加え、発煙及び発熱が終結するまで氷冷下攪拌した。その後、直ちに室温に戻し、引き続き 19 時間攪拌した。溶媒を減圧溜去した後、シリカゲルクロマトグラフィー (溶出液: 酢酸エチル) で精製し、4-ヨードトリフルオロアセトアニリドを薄褐色固体として得た (収量: 34.1 g, 収率: 94.8%)。

m. p. 148.5–149.0°C

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) ;  $\delta$  7.35 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.71 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.90 (br, 1H)

EI Mass ( $M$ ) $^+$  = 315

## 2) N'-トリフルオロアセチル-ss-3F(TFA 塩) の合成

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

フルオレセインナトリウム 3.77 g (10.0 mmol) をジメチルアセトアミド 50 ml に溶かし、20 分間攪拌した。これに 4-ヨードトリフルオロアセトアニリド 12.8 g (40.5 mmol) のピリジン 60 ml 溶液を混合し、さらに塩化銅 2.55 g (25.8 mmol) を加えて、アルゴン気流下 9 時間加熱還流した。この反応溶液を室温まで放冷した後、水 100 ml を加え、さらに濃塩酸 65 ml を加えて酸性にした。これを酢酸エチルで 3 回抽出し、有機層を集めて飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウム上で乾燥させて溶媒を減圧溜去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出液：酢酸エチル/*n*-ヘキサン = 1/1）で精製し、プレ ss-3F (TFA) を黄色固体として得た（収量：76.6 mg，収率：1.48 %）。

m. p. 116.5–118.5°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : δ 6.57–6.87 (m, 6H), 7.18 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.70–7.82 (m, 4H), 8.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H)

FAB Mass (*M*+1)<sup>+</sup> = 520

### 3) ss-3F の合成

プレ ss-3F (TFA) 76.6 mg (0.148 mmol) 及び無水炭酸カリウム 90.3 mg をエタノール 20 ml 及び水 1.2 ml の混合液に溶解して 4 時間加熱還流した。この溶液を室温まで放冷した後、エタノール及び水を減圧溜去した。残渣に水 20 ml を加え、さらに 2 N 塩酸 10 ml を加えて酸性にした (pH 1)。これをジクロロメタンで 2 回抽出し、有機層を集めて溶媒を減圧溜去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出液：酢酸エチル/*n*-ヘキサン = 1/1）で精製し、ss-3F を黄色固体として得た（収量：13.6 mg，収率：21.8 %）。

m. p. 153.5–155.0°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) : δ 6.60–6.89 (m, 10H), 7.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.72 (td, *J* = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.80 (td, *J* = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H)

FAB Mass (*M*+1)<sup>+</sup> = 424

## 例 4

## 1) 蛍光スペクトル

例 3 で得られた ss-3F を DMF に 10 mM の濃度に溶解した後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を加えて最終濃度が 10  $\mu$ M になるように溶解した。この 10  $\mu$ M ss-3F 溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを、日立製蛍光光時計 F4500 を用いて測定した。この際、スリット幅は励起スペクトル及び蛍光スペクトルともに 2.5 nm、フォトマル電圧は 950 V を使い、特に言及しない場合には励起波長 490 nm、蛍光波長 510 nm で測定した。結果を第 1 図に示す。第 1 図より明らかなように、ss-3F それ自体は蛍光を有さないことが確認された。

次に、ss-3F と一重項酸素との反応を調べるために、10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 1 mM、2 mM 及び 5 mM になるように EP-1 (一重項酸素の発生系であるナフタレンエンドパーオキシド系化合物: Saito, I., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, pp. 6329-6334, 1985) のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液を加えて、蛍光強度の時間変化を測定した (EP-1 系)。ただし、この時の溶液の温度は 37°C とした。結果を第 2 図に示す。また、反応終了後の溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを上記と同様の条件で測定した。結果を第 3 図に示す。第 2 図から明らかなように、ss-3F と EP-1 を共存させた場合、EP-1 の濃度及び時間依存的に蛍光強度の上昇が認められた。さらに第 3 図においても蛍光の発生が認められ ss-3F が一重項酸素との反応により蛍光を生じることが確認された。

さらに、ss-3F とヒドロキシラジカルとの反応を調べるために、10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 1 mM になるように過酸化水素を加え、その後 1 回につき最終濃度が 100  $\mu$ M になるように計 5 回、過塩素酸第一鉄を加え、蛍光強度の時間変化を測定した (Fenton 系)。結果を第 4 図に示す。第 4 図から明らかなように、過塩素酸第一鉄添加の度に蛍光強度の上昇が認められ、ss-3F がヒドロキシラジカルとの反応により、蛍光を生じることが確認された。



WO 01/64664

PCT/JP01/01504

## 2) 吸光スペクトル

ss-3F を DMF に 10 mM の濃度に溶解した後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を加えて最終濃度が 10  $\mu$ M になるように溶解した。この 10  $\mu$ M ss-3F 溶液の吸光スペクトルを測定した。結果を第 5 図に示す。ss-3F は 455 nm 付近に吸収極大を有することが確認された。

## 3) HPLC スペクトル

以下に示す溶液を HPLC で分析した。カラムは XTerra™ RP<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (4.6×250 mm) を使用し、溶出液はアセトニトリル/0.1M NaHCO<sub>3</sub> 水溶液=1/1 (0.1 %のトリフルオロ酢酸を含む)、溶出速度は 1 ml/分とし、460 nm の吸光度を測定した。

(A) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液

(B) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 5 mM になるように EP-1 を加えて、37°C で 8 時間反応させた反応溶液

(C) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 1 mM になるように過酸化水素を加え、さらに最終濃度が 500  $\mu$ M になるように過塩素酸第一鉄を加えて、約 3 時間室温に放置した溶液

(D) 1  $\mu$ M フルオレセイン溶液

ss-3F 単独の場合 (A)、保持時間 3.0 分にピークが検出された。一重項酸素発生系である (B) では (A) と異なる 2.3 分のピークが、ヒドロキシラジカル発生系である (C) では (A) と異なる 2.3 分のピークが検出された。(B)、(C) で検出されたピークは、フルオレセイン (D) のピーク 2.3 分と一致した。以上により、ss-3F は一重項酸素あるいはヒドロキシラジカルと反応し、フルオレセインが生成することが確認された。

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

例 5.:

## 1) 蛍光スペクトル

例 1 で得られた ss-3 を、励起波長は 370 nm、蛍光波長は 450 nm で測定する以外は例 4 の 1) と同様の条件で蛍光スペクトルを測定した。EP-1 が存在しない場合の結果を第 7 図に、EP-1 との反応終了後の溶液の蛍光スペクトルの結果を第 8 図に示した。第 7 図及び第 8 図より明らかなように、ss-3 それ自体は実質的に蛍光を有さず、一重項酸素との反応により蛍光を生じることが確認された。

## 例 6 : 各活性酸素種との反応 (特異) 性の比較

本発明の化合物 ss-1F、ss-3F について試験した。活性酸素種検出用試薬として市販されている DCHF-DA (2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート; モレキュラー・プローブ社、D-399) を加水分解することにより生成する DCHF (2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン) を対照として使用した。DCHF-DA をステファンらの方法 (Stephen L. Hempel et al., Free Radical Biology & Medicine, 27, 146-159, 1999) に準じてアルカリ性下、加水分解して DCHF を得た。即ち、暗所において DCHF-DA を pH 12 の水酸化ナトリウム水溶液で 30 分間処理後、直ちに 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で 10  $\mu$ M となるよう希釈した。10  $\mu$ M DCHF 溶液は調整後、直ちに試験に使用した。ss-1F、ss-3F も 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で 10  $\mu$ M 溶液を調整し試験に使用した。ss-1F、ss-3F、DCHF のそれぞれを a~f の条件で 30 分 (f のみ 2 時間 30 分) 処理し、処理前後の蛍光強度の変化を測定した。蛍光強度の測定は例 4 と同様の条件で行なった。蛍光プローブの濃度はいずれも 10  $\mu$ M (100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4) とした。結果を表 1 に示す。

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

表 1

活性酸素種	ss-1F	ss-3F	DCHF
ヒドロキシラジカル <sup>(a)</sup>	$3.3 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$	$4.8 \times 10^3$
一重項酸素 <sup>(b)</sup>	4.8	8.7	26
スーパーオキシド <sup>(c)</sup>	8.3	5.6	67
過酸化水素 <sup>(d)</sup>	1.8	<1.0	$1.9 \times 10^2$
一酸化窒素 <sup>(e)</sup>	6.0	<1.0	$1.5 \times 10^2$
自動酸化 <sup>(f)</sup>	<1.0	<1.0	$1.6 \times 10^3$

(a) 過塩素酸鉄(II) 100  $\mu$ M、過酸化水素 1 mM を加えた。(b) EP-1 100  $\mu$ M を加えた。(c)  $\text{K}_2\text{O}_2$  100  $\mu$ M を加えた。

(d) 過酸化水素 1 mM を加えた。

(e)  $\text{NOCl}_3$  100  $\mu$ M を加えた。

(f) 蛍光灯直下に 2 時間 30 分置いておいた。

DCHF はヒドロキシラジカル (条件 a) をはじめ、その他の活性酸素種ともよく反応した。また、本来反応することが望ましくない自動酸化 (条件 f) に対する反応性も同様に強かった。一方、ss-1F および ss-3F は自動酸化 (条件 f) を全く受けず、さらにヒドロキシラジカルに強い反応性を有していた。

#### 例 7 : ペルオキシダーゼ活性の特異的な検出

本発明の化合物 ss-1F あるいは ss-3F を DMF に 10 mM の濃度に溶解した後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) を加えて最終濃度が 10  $\mu$ M になるよう溶解した。この ss-1F あるいは ss-3F 溶液に、最終濃度が 0.2  $\mu$ M になるよう西洋ワサビペルオキシダーゼの 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) を加え、さらに最終濃度が 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0  $\mu$ M になるよう過酸化水素を添加し、

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

直ちに蛍光スペクトルを測定した。なお、蛍光波長 515 nm で測定する以外は例 4 の 1) と同様の条件で測定した。結果を第 9 図に示した。第 9 図より明らかなように ss-1F および ss-3F とも、過酸化水素濃度 0~5.0  $\mu$ M の範囲で濃度依存的な蛍光強度の上昇が認められた。

既に例 6 の結果より、ss-1F および ss-3F は過酸化水素自体とは反応せず、また自動酸化も受けないことが分かっている。従って、本例 7 の結果より、本発明の化合物はペルオキシダーゼ活性のみを特異的に測定できることが確認された。

#### 産業上の利用可能性

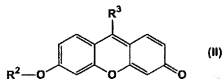
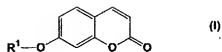
本発明の化合物は、ヒドロキシラジカル、一重項酸素などの活性酸素の測定用試薬として有用である。本発明の化合物を含む活性酸素測定用試薬及び上記化合物を用いた活性酸素の測定方法は、特に生体内の特定の細胞や組織中に局在する活性酸素をバイオイメージングの手法によって正確かつ簡便に測定するための試薬及び測定方法として有用である。

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

## 請求の範囲

1. 下記の一般式(I)又は(II)：



(式中、R¹及びR²はそれぞれ独立に置換基を有していてもよいアリール基を示し、R³は置換基を有していてもよい2-カルボキシフェニル基を示す)で表される化合物又はその塩。

2. R¹及びR²がアミノ基又は水酸基で置換されたフェニル基である請求の範囲第1項に記載の化合物又はその塩。

3. R³が2-カルボキシフェニル基である請求の範囲第1項又は第2項に記載の化合物又はその塩。

4. 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を含む活性酸素測定用試薬。

5. 活性酸素の測定方法であって、下記の工程：

(A) 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物又はその塩と活性酸素とを反応させる工程、及び

(B) 上記工程(A)で生成した脱アリール化合物又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法。

6. 酵素活性に活性酸素が関与する酵素の酵素活性を測定する方法であって、請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を用いる方法。

WO 01/64664

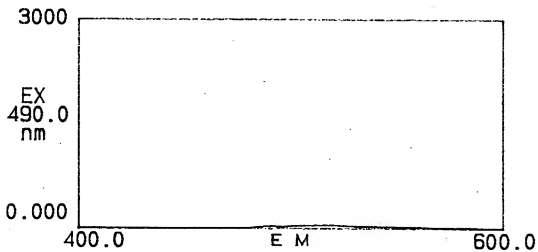
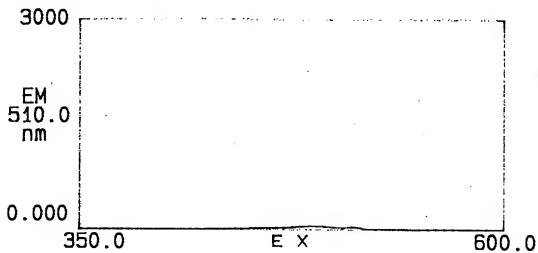
PCT/JP01/01504

7. 酵素がペルオキシダーゼである請求の範囲第6項に記載の方法。
8. 酵素活性に活性酸素が関与する酵素の酵素活性を測定するための試薬であつて、請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を含む試薬。
9. 酵素がペルオキシダーゼである請求の範囲第8項に記載の試薬。

WO 01/64664

PCT/JP01/01504

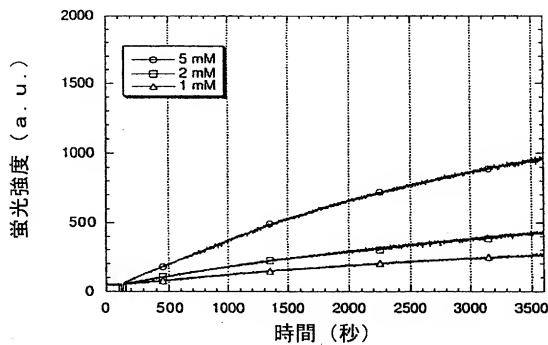
## 第 1 図



WO 01/64664

PCT/JP01/01504

## 第2図

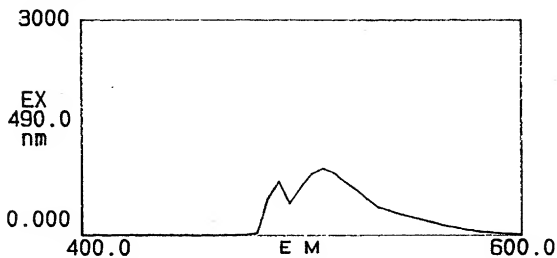
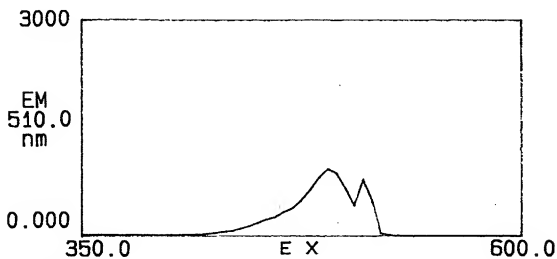




WO 01/64664

PCT/JP01/01504

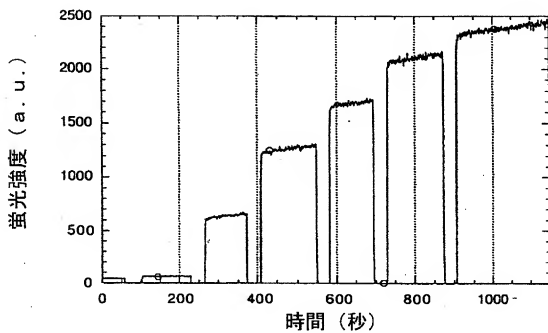
第3図



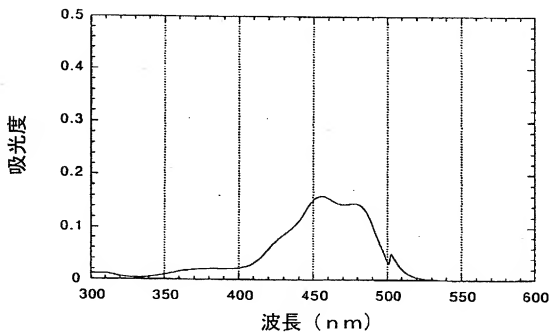
WO 01/64664

PCT/JP01/01504

第4図



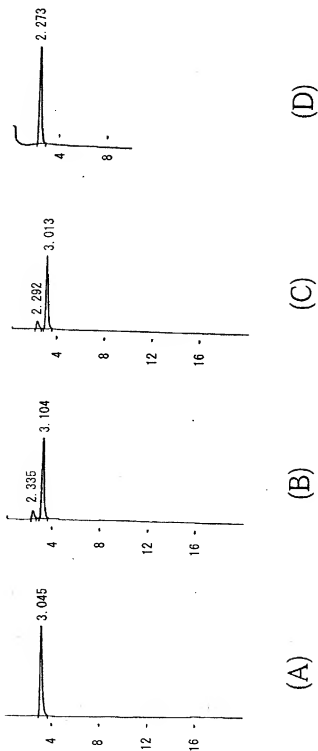
第5図



WO 01/64664

PCT/JP01/01504

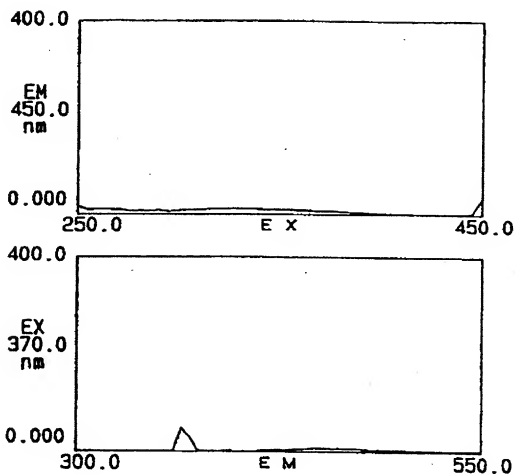
## 第6図



WO 01/64664

PCT/JP01/01504

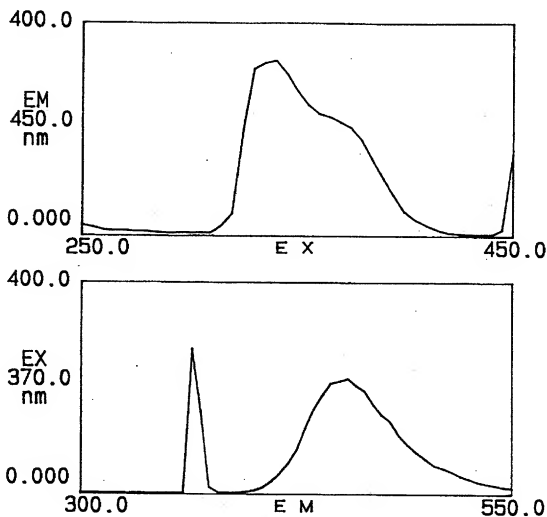
## 第 7 図



WO 01/64664

PCT/JP01/01504

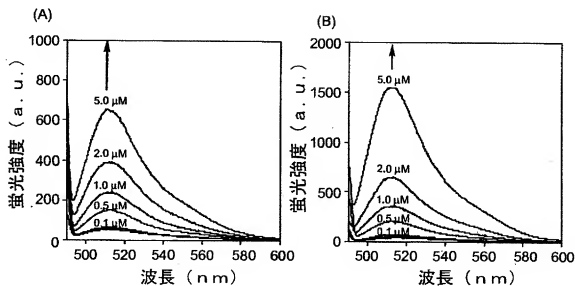
## 第 8 図



WO 01/64664

PCT/JP01/01504

## 第9図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. <sup>7</sup> C07D311/16, C07D311/82, G01N31/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. <sup>7</sup> C07D311/00-96, G01N31/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 515133, A2 (Spectra Group Ltd. Inc.), 25 November, 1992 (25.11.92), entire description & JP, 6-211831, A & WO, 95/14689, A1 & US, 5623080, A	1-9
A	JP, 60-54381, A (Mitsui Toatsu Chemicals Inc.), 28 March, 1985 (28.03.85), entire description (Family: none)	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:          "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance          "E" earlier document but published on or after the international filing date          "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)          "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means          "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention          "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone          "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art          "&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 05 June, 2001 (05.06.01)		Date of mailing of the international search report 19 June, 2001 (19.06.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/SA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO1/01504	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. <sup>7</sup> C07D311/16, C07D311/82, G01N31/00			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. <sup>7</sup> C07D311/00-96, G01N31/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	EP, 515133, A2 (Spectra Group Ltd. Inc.) 25. 11. 1992 (25. 11. 92) 文献全体 &JP, 6-211831, A &WO, 95/14689, A1 &US, 5623080, A	1-9	
A	JP, 60-54381, A (三井東圧化学株式会社) 28. 3月. 1985 (28. 03. 85) 文献全体 ファミリーなし	1-9	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日以前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に異議を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を算立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 05. 06. 01		国際調査報告の発送日 19.06.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高岡 裕美 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	